



TITLE:

小胞体酸化酵素のダイナミックな局在制御メカニズム(Digest_要約)

AUTHOR(S):

垣花, 太一

CITATION:

垣花, 太一. 小胞体酸化酵素のダイナミックな局在制御メカニズム. 京都大学, 2014, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18115>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2020-10-01に公開

小胞体酸化酵素のダイナミックな局在制御メカニズム

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理系

垣花 太一

背景 膜タンパク質や分泌タンパク質は、合成とともに小胞体内腔へと輸送され、小胞体内腔に局在するシャペロンや翻訳後修飾酵素の助けを受けてフォールディングし、正しいコンフォメーションを獲得する。このフォールディング過程において重要な反応にジスルフィド結合形成反応がある。新規合成タンパク質へのジスルフィド結合形成は、Protein disulfide isomerase (PDI) を中心とした酸化還元酵素群によるジスルフィド結合交換反応のリレーにより促進される。小胞体内腔に局在する二つの酸化酵素、endoplasmic reticulum oxidoreductin-1- α (Ero1 α) と peroxiredoxin-4 (Prx4) は、新規にジスルフィド結合を形成し、ジスルフィド交換リレーにおいてPDIの上流の酸化酵素として機能する。興味深いことにEro1 α とPrx4はもう一つの共通点をもつ。それは、Ero1 α もPrx4も小胞体残留シグナルをもたないという特徴である。

そこで、本研究では、小胞体内の恒常性維持や細胞の新陳代謝に関わるEro1とPrx4の二つの小胞体内腔の酸化酵素がいかに小胞体局在シグナルをもたずに小胞体に留まることができるのか、そして、なぜ二つの重要な酵素が同じように小胞体残留シグナルをもたないのかという二点に着目して研究を行うことにした。

フォールディング異常病と言われる、ハンチントン病やアルツハイマー病を発症した細胞において、小胞体ストレスが惹起されていることが報告されている。こうした病気の原因となるタンパク質の多くは凝集体をサイトゾルで形成する。しかしながら、いかにサイトゾルでのタンパク質の品質管理の低下が、小胞体内腔へ影響を与えるのかは全く分かっていなかった。

そこで本研究では、実験モデルとして線虫とヒト細胞を用いて、サイトゾルにおけるタンパク質ホメオスタシスの低下が小胞体内腔の、特に小胞体レドックス環境にどのような影響を与えるかについて、レドックスセンサー蛍光タンパク質を用いて観察した。

方法 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS)、マウス抗体産生細胞を用いた共免疫沈降実験 (Co-IP)、HeLa細胞を用いた免疫染色実験、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いたタンパク質相互作用解析、免疫沈降実験、RNAi法を用いたノックダウン実験、分泌アッセイ実験、小胞体レドックスセンサーを用いたEro1 α やPrx4のKDEL付加変異体の小胞体レドックスへの影響の解析

結果 小胞体残留シグナルをもたないPrx4の小胞体局在メカニズムを明らかにするため、産総研夏目徹博士らとの共同研究の下、LC-MS/MS解析による相互作用分子を同定した。その結果、Prx4が、同じく小胞体酸化酵素であるEro1 α と似たタンパク質相互作用をすることが示唆された。特に、Prx4とEro1 α は、小胞体内の酸化還元酵素ファミリーであるPDIファミリーとの結合をよく示したことから、それらのPDIファミリータンパク質に特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロッティングによってPrx4とEro1 α の免疫沈降タンパク質を解析した。その結果、やはり、Prx4とEro1 α が共通して、PDIファミリータンパク質と結合することが確認された。特に、Ero1 α は、ERp44とPDIによって細胞内に係留されていることが報告されていたことから、以後ERp44とPDIとの関係に着目した (Otsu et al., Antioxid. Redox Signal., 2006)。

PDIは、小胞体に局在し、新生タンパク質のジスルフィド結合形成・異性化を触媒するだけでなく、疎水的領域を介して、シャペロンとして機能する。ERp44は、ユニークなPDIファミリーメンバーで、他のPDIファミリーとの大きな違いが3つある。それは、酸化還元酵素ではなくシャペロンとして機能する点、小胞体ではなく、小胞体-ゴルジ中間体 (ERGIC) に局在する点、そして、酸性から中性のpHで構造変化を生じる点である。

免疫染色実験から、Prx4とEro1 α がPDIとERp44の両者と共局在すること、過剰発現によって細胞外に分泌されてしまうPrx4とEro1 α を、共発現されたPDIとERp44が細胞内に留めることから、PDI

とErp44がPrx4とEro1 α を小胞体内に維持していることが示唆された。Prx4とEro1 α が、同じ局在メカニズムを共有することは、Ero1 α を共発現したときに、より多くのPrx4が細胞外に分泌されてしまうことから裏付けられた。しかしながら、逆にPrx4を共発現させても、Ero1 α が細胞外に分泌される量にはほとんど影響を及ぼさなかった。これは、細胞内でPrx4とEro1 α を係留する効率に差があることを示唆すると考えられた。

そこで、精製したPrx4、Ero1 α 、PDI、Erp44を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いたタンパク質相互作用解析を行った。その結果得られた解離定数KD値から、PDIとEro1 α の結合力が、PDIとPrx4の結合力の約5倍強いこと、また一方で、Erp44はEro1 α とPrx4に同程度の結合力をもつことが判明した。さらに、こうした試験管内の二分子間の結合力の差が、細胞内では係留の優位さの違いとして観察できるかを検証した。競合関係にあるPrx4とEro1 α を細胞内に同時に発現させた細胞に対して、濃度を振ってPDIもしくはErp44を共発現させ、分泌タンパク質を解析した。その結果、PDIの共発現では、Prx4よりもEro1 α の分泌が優先的に抑制され、一方で、Erp44の共発現では、Prx4とEro1 α の分泌量は同等に抑制されていた。

さらに、Erp44が、分泌経路において小胞体の次のコンパートメントであるERGICに局在するという特徴をもつことから、Erp44がPDIのバックアップとして、PDIが小胞体で係留できなかった分子をERGICで留めているのではないかと考えた。RNAi法を用いたノックダウン実験から、Erp44、PDI、そして両者を効率よく発現抑制できる条件を見出し、その条件下での内在性のPrx4とEro1 α の細胞外への分泌を解析した。その結果、予想通りPDIのノックダウンでは、Prx4もEro1 α も細胞外には分泌されなかったが、PDIとErp44の両者をノックダウンしたときには、著しく内在性のPrx4とEro1 α が細胞外へと分泌することが確認できた。また、免疫染色実験によって、PDIのノックダウン細胞でPrx4とEro1 α のErp44との共局在を確認したところ、PDIノックダウン細胞で両者が、Erp44とドット状の小胞 (vesicle) パターンの共局在を示した。このことから、Erp44がERGICでPDIのバックアップとして、分泌経路へ漏れ出たPrx4とEro1 α をERGICで留めていることが示された。以上の結果から、Prx4とEro1 α の「Two-step retention mechanism」を明確に証明することができた。

また、Prx4とEro1 α は機能的には、小胞体内のジスルフィド結合を担う重要な小胞体酸化酵素であることから、Two-step retention mechanismの生理学的意義を検証した。そのために、まず小胞体レドックスセンサータンパク質であるER-roGFPiEを用いた小胞体レドックス状態観察の実験系を構築した。そしてつぎに、小胞体残留シグナルを付加させたPrx4-KDEL、Ero1 α -KDEL変異体を作成し、野生型との比較のもと、それぞれの発現細胞の小胞体レドックス状態を観察したところ、KDEL変異体で有意に小胞体内がより酸化的環境へとシフトしていることが判明した。

ポリQタンパク質の発現などによるサイトゾルのタンパク質ホメオスタシスの低下と小胞体内のレドックス・ホメオスタシスの影響について、HeLa細胞でER-roGFPiEを用いて解析を行った。その結果、種々のストレスによるサイトゾルのタンパク質ホメオスタシスの低下が、小胞体内のレドックス・バランスを還元側へとシフトさせていることが分かった。

考察 本研究から、小胞体残留シグナルをもたないEro1 α とPrx4が、分泌経路において二段階に係留されていることがわかった。さらに、小胞体残留シグナルを融合させた変異体のEro1 α やPrx4の発現が、小胞体内のレドックス状態をより酸化的にシフトさせることが観察された。これは、主要な小胞体酸化酵素Ero1 α およびPrx4が、単に小胞体に常に局在するということ以上に、このダイナミックな局在メカニズムを利用して、小胞体とERGICを必要に応じて移動しつつ、小胞体内のレドックス・ホメオスタシスを制御するという生理学的な意義を意味する。

また、サイトゾルのタンパク質ホメオスタシスの低下が小胞体内のレドックス・バランスを攪乱させることが分かった。小胞体内の酸化的環境はタンパク質分泌とも密接に関わり、細胞レベルだけでなく、さらに個体レベルでの解析を行わなければならない。